

免疫不全マウス再構成皮膚における 培養毛乳頭細胞による毛包形成誘導と関連因子の検討

聖マリアンナ医科大学

窪田 泰夫

Living human skin equivalents, in which human keratinocytes are cultured on collagen matrix containing human dermal fibroblasts, have been successfully transplanted and maintained for a long time on deep connective tissue of immunodeficient mice. Here, we cultured human dermal papilla cells in the type I collagen gels and overlaid by primary culture of human epidermal cells concomitant with a few melanocytes as a composite graft.

We examined effects of human dermal papilla cells derived from human hair follicle on the induction of hair follicle after xenotransplantation of the composite grafts into immunodeficient mice. At three weeks after transplantation, the epidermal cells generated human epidermis-like tissue. Histological examinations revealed that no epidermal elongation or newly formed follicular-like structure were observed. Interestingly, a significant number of DOPA positive melanocytes, which were initially concomitant in a primary epidermal cell culture, was found not only in the epidermal basal layer but also in the entire mid-dermis, while the transplantation of a composite grafts in immunodeficient mice by using human fibroblasts instead of dermal papilla cells showed the presence of a small number of melanocytes in the basal layer only.

These results indicates that human dermal papilla cells facilitate the maintenance or migration of the melanocytes in the xenotransplantation of composite grafts, a living human skin equivalents.

The present system by using the xenotransplantation of composite grafts in immunodeficient mice also seems to be the good models for studying the cell-cell (epithelial-mesenchymal) interaction.

1 緒言

免疫不全マウスに培養細胞を移植して作製するヒト皮膚再構成システムは表皮細胞と真皮線維芽細胞との相互作用の検討に有用である。さらに表皮細胞と線維芽細胞以外にもさまざまな細胞種を組み合わせて移植することで任意の細胞の in vivo に近い状況下での機能や各種細胞間の相互作用を解析することが可能な実験系と考えられている。

毛乳頭細胞は毛母の構成細胞の一つで毛幹形成の上で重要な役割を果たしていることが指摘されている¹⁾。近年、細胞培養技術の進歩や細胞成長因子の発見により毛乳頭細胞はヒト毛包からも単離可能となり、長期の純培養も行なわれている²⁾。

今回われわれはヒト皮膚の in vivo 実験系として利用できる免疫不全マウスを用いた再構成皮膚の線維芽細胞に代って培養ヒト毛乳頭細胞を用いて同様の再構成皮膚を作製して毛包形成の誘導を検討した。また表皮細胞と線維芽細胞による再構成皮膚の中に直接的に毛乳頭組織を注入して、三者の共存のもとでの毛包形成の誘導についても検討した。

2 実験 (材料と方法)

2.1 SCID マウスの改良と供給

本研究で使用した SCID マウスの多くは BALB/cA を遺伝的背景にもつ系統である。この BALB/cA-SCID マウスは高い繁殖性を有し、ビニールアイソレーターを用いて生産と供給を行なった。また定期的に微生物的汚染事故の発生を検討した。

2.2 細胞培養

a) ヒト表皮細胞

皮膚科手術材料よりフリーハンドデルマトー

The effects of human dermal papilla cells on the induction of hair follicle after xenotransplantation of the composite graft into immunodeficient mice.

Yasuo Kubota

St. Marianna University, School of Medicine, Department of Dermatology



ムにて皮膚を薄く採取し、トリプシンないしデイスパーゼ処理により分散させた表皮細胞を低カルシウム無血清培地 (KGM; Clonetic 社、カルシウム濃度 0.15 mM) にて培養を行なった。

b) ヒト線維芽細胞

皮膚科手術材料より得られた健常皮膚を型の如く explant culture を行ない、皮膚切片から遊走する紡錘状細胞を 10% FCS 添加 EagleMEM 培地 (MEM; IBL, 免疫生物研究所) にて継代して使用した。

c) ヒト血管内皮細胞

臍帯静脈から 0.1% コラゲナーゼによる酵素灌流法により単離した。培養液は M-199 培地に 20% FCS、血管内皮増殖因子、ヘパリンを添加し、ファイブロネクチンをコートした培養皿で培養を行なった。形態学的にいわゆる敷石状を呈し、免疫染色により第 8 因子関連抗原陽性を確認した。

d) ヒト毛包毛乳頭細胞

毛根の下方は膨大し、毛球を形成し、その中には毛乳頭をいれている (図 1)。この毛乳頭の毛器官における生物学的意義は少ない。すなわち毛乳頭は毛包の発育や増殖を誘導し、毛組織の形成や維持において重要な役割が指摘されており、男性ホルモン作用にも深い関係があることが判明している³⁾。この毛乳頭を構成するヒト毛乳頭細胞は未分化の間葉系細胞で互いに密着して塊状をなして存在する。

ヒト毛包毛乳頭の単離と培養は Messenger ら⁴⁾の方法に準じて行なった。まず正常人被髪頭部皮膚より毛包を採取し、実体顕微鏡下に 23G の注射針を用いて採取した毛包をその周囲を被う結合組織性被膜から切開、反転し、毛乳頭を露出させ、その基部から切断して毛乳頭を単離した。この過程で毛乳頭に決して暴力的に物理的刺激を加えて破損せしめないことが重要である。単離した毛乳頭は予め 1 mg/mL のヒトファイブロネクチンで

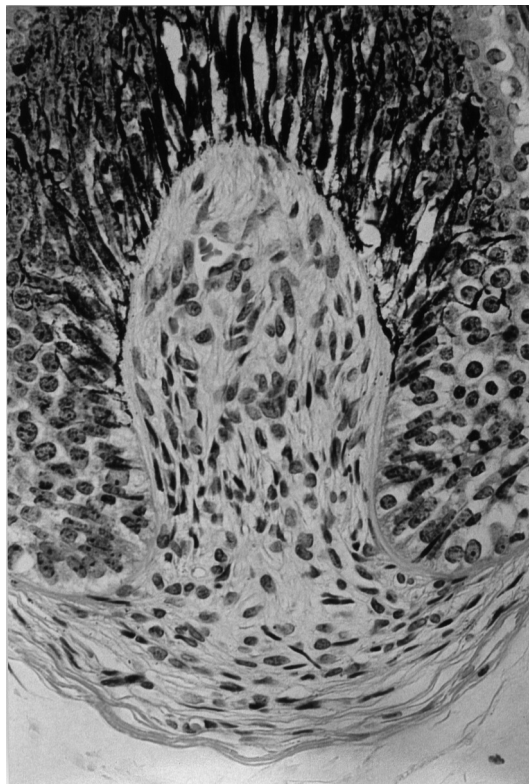


図 1 ヒト毛包の構造 (HE 染色)

コーティングした 35mm 培養皿に数個移して組織培養した。基本培養液としては 20% FCS 添加の Medium 199 を使用した。通常、48 時間程度のあいだに単離した毛乳頭から辺縁に向かって紡錘状の毛乳頭細胞が増殖、伸展していく所見が観察された (図 2)。培養液は三日に一度新しいものに替えた。この際に培養皿に付着の完全でない毛乳頭を誤って除去しないようにする。数日後毛乳頭細胞が confluent な状態になると型のごとく 0.25% トリプシン-EDTA 溶液にて継代培養し、通常 7~8 継代の培養が可能となっている。培養が 7~8 代を越えると毛乳頭細胞の形態は大型化し、細胞は 2 極の紡錘状から多極化を呈してきた。毛乳頭細胞の生存期間はやや短く、線維芽細胞の継代培養可能数の $1/2 \sim 1/3$ 程度に短い。

なお上述のいずれのヒト細胞も 0.25% トリプシン-EDTA 溶液により継代した。なおヒト表皮細胞は初代培養を用い、その他の細胞種では 3~7

継代を実験に供与した。

2.3 Composite graft 法によるヒト再構成皮膚の作製

培養線維芽細胞 1×10^6 個を I 型コラーゲン液 (新田ゼラチン社) の中に懸濁させて 12 皿培養シャーレでゲル化させる。続いてそのコラーゲンゲルの上に別途培養調整しておいたヒト表皮細胞 (初代) 1×10^6 個を重層させ Composite graft を作製した。数日後ゲルは収縮して培養皿辺縁から剥がれてくるので、BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植し、生体接着剤を用いてマウス皮膚により保護した。3 週間後にマウス皮膚を除去して開窓し、再構成皮膚の状態を観察した (図 3)。

2.4 ヒト血管内皮細胞およびヒト毛乳頭細胞を用いた SCID マウスでのヒト再構成皮膚の作製

血管内皮細胞および毛乳頭細胞をそれぞれ線維芽細胞の代わりにコラーゲンゲル中に懸濁させ、同様にその上に表皮細胞を重層して Composite graft を作製し、BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植した。

2.5 SCID マウスでのヒト再構成皮膚へのヒト毛乳頭組織の注入実験

線維芽細胞と表皮細胞による Composite graft を作製したのち、実体顕微鏡下にヒト毛包から単離した毛乳頭組織を直接的に Composite

graft のコラーゲンゲル中に注入した。その後に BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植して、3 週間ののち再構成皮膚の形成を観察して組織学的観察を行なった。

2.6 組織学的検討

コラーゲンゲルの移植 3 週間後の開窓時に移植片の状態を確認して、肉眼的ならびに組織学的所見を検討した。組織学的検討のために通常ホルマリン固定・HE 染色のほか、フォンタナ・マッ

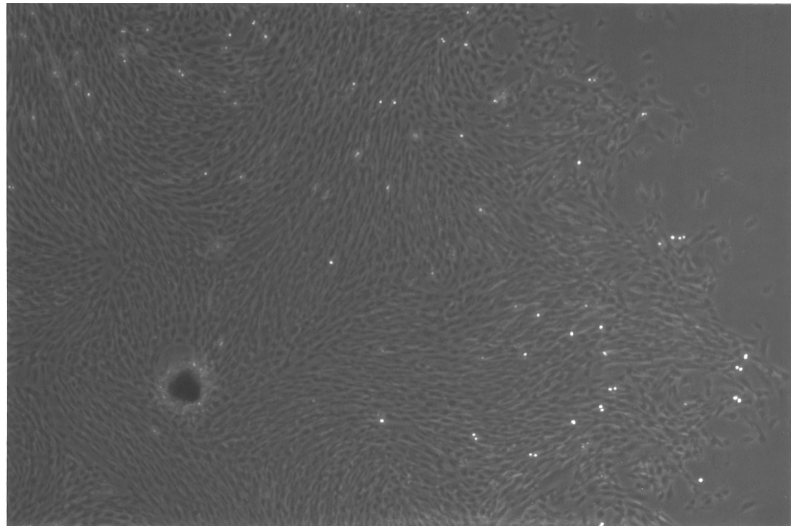


図2 培養ヒト毛乳頭細胞 (相差像)

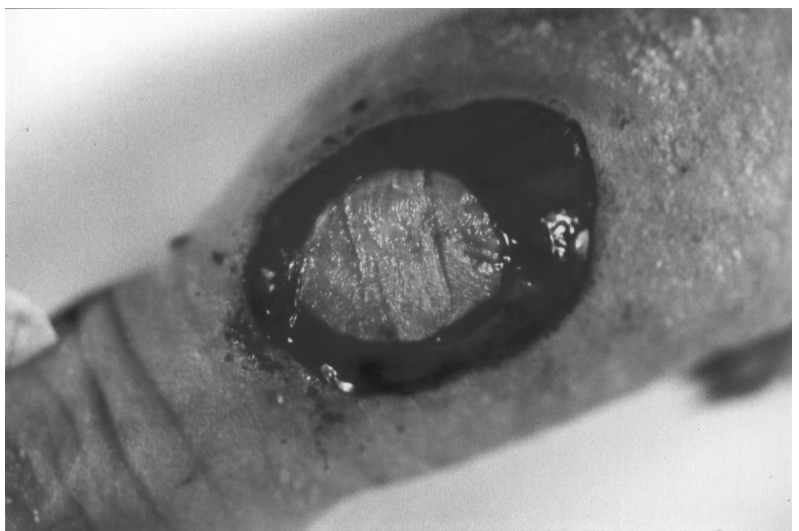


図3 線維芽細胞により作製した composite graft の nu/SCID マウスへの移植後に形成された再構成皮膚。マウス背部皮膚の開窓時の所見。

ソン染色および凍結切片標本を作製して DOPA 反応を行なった。

2.7 単離ヒト毛包の凍結保存と男性ステロイドの作用

これまではヒト毛包の移植は頭皮皮膚の入手時に限られてしまう欠点があったので、その実用性を高めるため単離したヒト毛包を凍結保存して BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植した。

すなはち、同一ドナーから採取した単離毛包をそのまま直ちに SCID マウスに移植する群と凍結保存してから移植する群の 2 群に分けた。凍結保存方法は単離した毛包を DMSO 添加細胞凍結用保護培地 (cell stock media, 免疫生物研究所) に浸漬して凍結用チューブにいれてドライアイスにて凍結させて、液体窒素中に 1 週間以上おいて移植実験を行なった。実験に際しては移植の直前に 37℃ の温湯にて急速に融解し麻酔下の BALB/cA-nu, SCID マウスの背部皮膚に移植した。生体用接着剤および皮膚被覆剤にて固定保護して、経時的に毛幹の伸長を観察した。そして、毛包採取後直ちに移植する群と凍結保存してから移植する群との間で毛包生着率を比較した。

この系によりヒト毛包を生体環境下に長期間維持可能となるためヒトでは行ないにくかった実験に利用できると考えられた。例えばヒトへの男性ステロイドの投与は危険性があり容易ではない。そこでこの移植毛包において男性ステロイドの作用を検討した。すなはち毛包が生着して毛幹の伸長が確認された例に関してエナント酸テストステロン (Enarmon depot) 5 mg を週一回皮下注射にて投与した。対照としては胡麻油を投与し、経時的に移植毛包の変化を観察した。

3 結果

3.1 SCID マウスの改良

BALB/cA-SCID マウスは加齢に伴い、Leaky 現象が出現することと、胸腺腫が発生することが欠点とされていた。しかしわれわれはこの

SCID マウスに改良を加えて nu 遺伝子を導入して BALB/cA-nu, SCID マウスを育成した。このマウスにはこれらの欠点はみられずレシピエント動物として高い評価が得られるものと考えられた。しかしながらこの BALB/cA-nu, SCID マウスは生産効率が他種と比較してやや低く、生産規模拡大の点で若干の問題を残している。

3.2 SCID マウスでのヒト再構成皮膚の作製

線維芽細胞と表皮細胞からなる Composite graft は移植後 3 週目に開窓した時点では、組織上、数層の表皮細胞の層とコラーゲングル中に紡錘状の線維芽細胞が散在する真皮が形成されており、いわゆるヒト皮膚の構造を呈していた。また使用した表皮細胞は初代培養であるため混入したメラノサイトが表皮基底層に分布しており、肉眼的にも再構成された皮膚面にはわずかに黒褐色色素沈着の所見が確認された。

3.3 ヒト血管内皮細胞およびヒト毛乳頭細胞を用いた SCID マウスでのヒト再構成皮膚の作製

血管内皮細胞を用いた移植片は移植後 3 週目には開窓時に皮膚様の構造が形成されていなかった。すなはち少量の細胞残骸物とコラーゲン基質のみがマウス皮下に残存しているにすぎなかった。これは血管内皮細胞はコラーゲングル中において拘縮せず、ゲル組織を十分に支持することができなかったものと思われた (data not shown)。

一方、毛乳頭細胞により作製した Composite graft のマウス移植片では、開窓時に肉眼的には線維芽細胞による場合とほぼ同様の再構成皮膚の形成が確認された。しかし組織学的には毛乳頭細胞を使用した場合と線維芽細胞の場合ではメラノサイトの分布やメラニン顆粒の沈着の点で大きな差異が認められた。すなはちフォンタナ・マッソン染色や DOPA 反応を施行したところ、コラーゲン中に線維芽細胞を混じた場合ではメラニン顆粒や DOPA 陽性メラノサイトは表皮細胞層の最

下端のみに少数存在するのに対して、毛乳頭細胞による再構成皮膚では表皮層のみならず真皮(コラーゲン層)へもメラニン顆粒やメラノサイトが

著明に認められた(図4a、b、c、d)。

3.4 SCID マウスでのヒト再構成皮膚へのヒト毛乳頭組織の注入実験

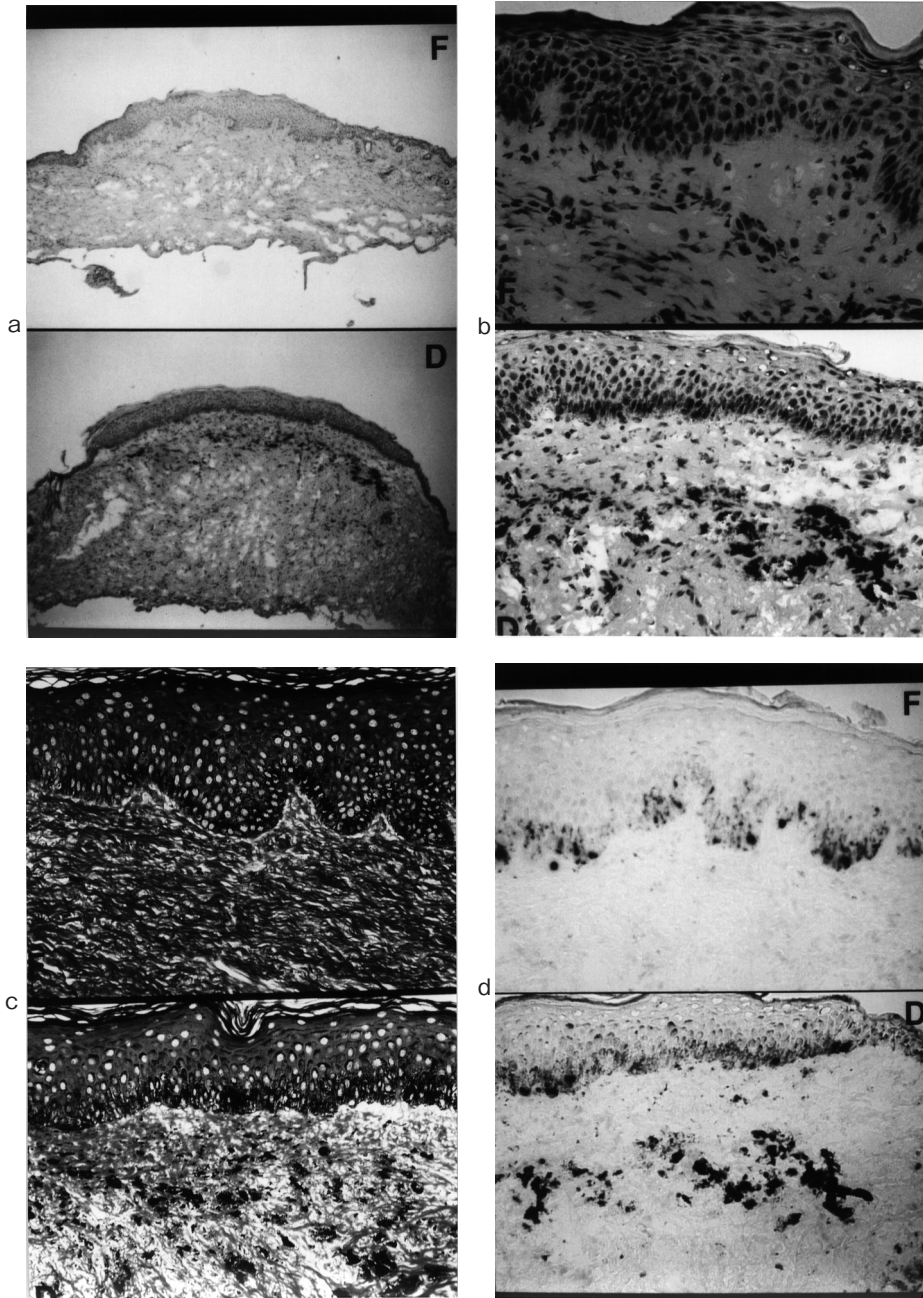


図4 F=線維芽細胞により作製した再構成皮膚組織.D=毛乳頭細胞により作製した再構成皮膚組織.a; HE染色(弱拡、×10)、b; HE染色(強拡、×50)、c; フォンタナ・マッソン染色、d; DOPA反応。毛乳頭細胞による再構成皮膚では真皮層にもメラノサイトやメラニン顆粒を多数認めた。また表皮層肥厚の程度も両者の間に差が見られた。

実体顕微鏡下にヒト毛包から単離した毛乳頭組織を直接的に線維芽細胞と表皮細胞を用いて作製した Composite graft のコラーゲンゲル中に注入した。開窓後に組織学的に検討した結果、コラーゲンゲルの中に毛乳頭組織は残存していたが、その被覆表皮や周辺の線維芽細胞にはとくに変化を認めることはなかった (data not shown)。

3.5 単離ヒト毛包の凍結保存法の確立と男性ステロイドの移植凍結ヒト毛包への影響

5例の健常頭皮から得られた毛包についてその BALB/cA-nu, SCID マウス皮膚への生着率は凍結保存の有無によりなんらの影響も受けなかった (表1)。さらにその生着した毛包の組織学的変化も未凍結のものと比較して差異はなかった (図5)。このことは毛包のマウスへの移植実験が頭部皮膚入手時にのみ制限されることがなく実用性の向上が図られた。

毛包が生着して毛幹の伸長が確認された例に関してエンアント酸テストステロン (Enarmon depot) 5mg を週に一回の割合で合計6回投与した。対照群と比較して投与群5本の内2本において毛幹が脱落して移植した毛包にも退行変性を生じた (data not shown)。変化の認められなかった毛包

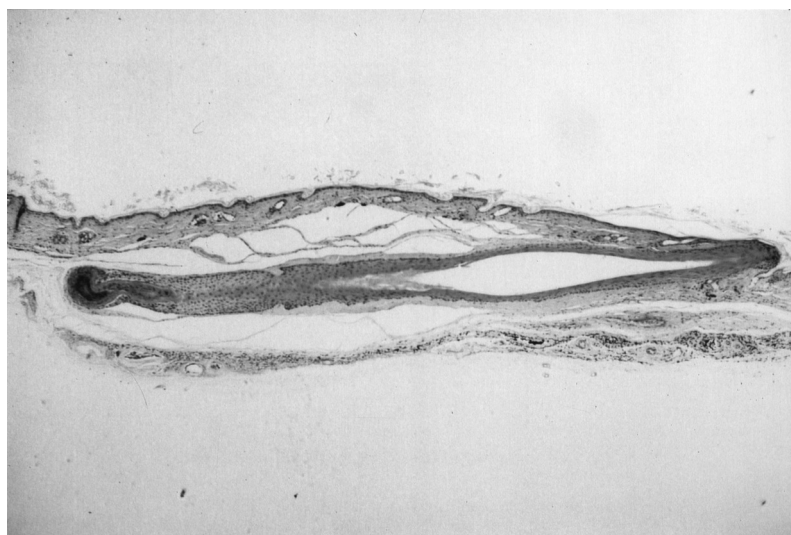


図5 凍結単離毛包の組織像。移植3カ月目 (HE染色)。未凍結毛包のそれとほぼ同様であった。

表1: ヒト単離毛包の nu/SCID マウスへの移植における凍結保存の影響。

実験番号	凍結		未凍結	
	正着本数	移植本数	正着本数	移植本数
#1	0	20	4	13
#2	3	6	1	6
#3	11	19	3	13
#4	10	24	3	13
#5	1	23	5	13
計	25	92	16	58
	(27.2%)		(27.6%)	

も認められた点は毛包採取部位の差 (頭頂部、側頭部) あるいは検体間の差を反映している可能性もある。

4 考察

ある特定の異常を有する実験動物の作製はこれまでの研究材料や方法ではアプローチが困難であった諸問題の解明に重要な糸口を与えてくれることがある。近年、T細胞およびB細胞を欠如した SCID マウスを用いて正常のヒト皮膚由来細胞の増殖や分化過程の解析が進んできている^{5, 6, 7)}。

in vitro で培養された各種のヒト皮膚由来の細胞を動物に移植することにより in vivo で増殖分化させることができれば、個々のヒト皮膚由来の

細胞レベルでの研究が in vivo に一層近い状態で行なうことができる。SCID マウスへの培養細胞移植によるヒト皮膚再構成システムは各種の細胞の in vivo での働きを解析するのに有用な手段と考えられ、皮膚の悪性腫瘍や感染症などのヒト疾患の病態解明、あるいは上皮系と間葉系の相互作用の解明など多くの研究分野に利用できるものと考えられる。

残念ながら、当初に目指していたヒト再構成皮膚内

での培養毛乳頭細胞による毛包形成の誘導は成功し得なかった。今後、このヒト皮膚再構成システムに毛乳頭細胞のほかに毛母の上皮細胞(外毛根鞘細胞)の混合培養を行ったり、線維芽細胞増殖因子(FGF)や肝細胞増殖因子(HGF)などの毛髪成長に働くと考えられている各種成長因子の添加などを試みる予定である。しかし毛乳頭細胞による再構成皮膚では表皮基底層ならびに真皮にまで及ぶメラノサイトの浸潤が認められた。生体においては毛乳頭細胞はメラノサイトの豊富な毛母の基部に存在している。前述の所見は毛母における両細胞の相互作用、とりわけ毛母における毛乳頭細胞の毛母上皮内のメラノサイトの遊走や生存、維持に対する重要な関与を示唆する興味深いものと考えられた。さらにこの毛乳頭細胞からのメラノサイトに対する因子(サイトカイン?、細胞成長因子?)の同定を進める必要がある。最近、Randallら⁸⁾のグループは培養毛乳頭細胞からSCF(stem cell factor、幹細胞増殖因子)の産生・分泌を報告している。今回の実験においても毛乳頭細胞を用いた再構成皮膚に認められたメラノサイトの動態に関与する因子の一つとしてこのSCFが考えられる。

BALB/cA-nu, SCIDマウス皮膚への凍結ヒト毛包の移植生着は凍結保存によりなんらの影響も受けなかった。さらに生着した毛包の組織学的変化も未凍結のものと比較して差異はなかった。このことは毛包のマウスへの移植実験が頭部皮膚入手時にのみ制限されることがなく遠隔地への輸送も確実にこなえるなど、実験システムとしての実用性を高めたものと思われる。さらに今回、SCIDマウスに移植された毛包が生着して毛幹の伸長が確認されたヒト凍結毛包に対して男性ホルモンの投与実験を行なったが、本実験系はヒトへの実験的投与が必ずしも容易ではないその他の薬剤のヒト毛包に対する直接的な効果をみるのが可能なシステムでありその有用性が期待される。

謝 辞

本研究を行なうにあたりご援助をいただいた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

なお、本研究の一部は平成9年10月松本市で開催された日本皮膚科学会東部支部総会学術大会、ワークショップにおいて発表した。

引用文献

- 1) Jahoda CAB, Reynolds AJ: Dermal-epidermal interactions-Follicle-derived cell populations in the study of hair-growth mechanisms. *J Invest Dermatol*, 101:33S-38S,1993.
- 2) 久志本常人、窪田泰夫、河陽子、ほか3名: 酵素処理、細胞外マトリックスおよび細胞成長因子が培養毛乳頭細胞に与える影響、*日皮会誌*、106:249-259、1996.
- 3) 板見 智: ヒト毛乳頭細胞と外毛根鞘細胞の相互作用。組織培養工学、23: 52-56、1997.
- 4) Messenger AG. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br J Dermatol*, 114:425-430,1986.
- 5) McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H., et al. The SCID-hu mouse; murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*241:1632-1639,1988.
- 6) 野村大成: がん研究における SCID マウスの重要性。 *Oncologia*,26:321-328,1993.
- 7) Christofidou-Solomidou M, Longley BJ, Whitaker-Menezes D, et al. Human skin/SCID mouse chimeras as an in vivo model for human cutaneous mast cell hyperplasia. *J Invest Dermatol*, 109:102-107,1997.
- 8) Hibberts NA, Messenger AG, Randall VA, Dermal papilla cells derived from beard hair follicles secrete more stem cell factor (SCF) in culture than scalp cells or dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212:988-994, 1995.